动 物 学 研 究 2007, Jun. 28 (3): 303-310　　CN 53-1040/Q　ISSN 0254-5853
Zoological Research

原癌基因FOS蛋白、雌二醇及其受体在中国林蛙不同时期精巢中的表达

杨　纯[1,2], 张育辉[1,*]
(1. 陕西师范大学生命科学学院, 陕西 西安　710062; 2. 山西师范大学生命科学学院, 山西 临汾　041004)

摘要: 用免疫细胞化学方法检测了原癌基因FOS蛋白、17β-雌二醇(E_2)和雌激素受体(ER)在中国林蛙生精周期中不同时期精巢内的表达定位。结果显示: 在中国林蛙生精周期的Ⅰ—Ⅴ期, E_2和ER在精原细胞、精母细胞、精子细胞、精子、支持细胞和间质细胞内均有表达。在不同时期的精巢中, E_2和ER在生精细胞的定位具有一致性: 在Ⅱ—Ⅲ期, 精子细胞的E_2和ER阳性表达最强; 在Ⅲ期, 精子中E_2和ER阳性反应强度显著高于Ⅳ—Ⅴ期($P<0.01$)。在生精周期的Ⅰ—Ⅴ期, 支持细胞中, E_2和ER表达强度经历由强减弱再增强的变化过程。在生精周期的Ⅲ期, 间质细胞中E_2和ER阳性反应强度高于其他各期。除精子外的生精细胞, 支持细胞和间质细胞内均有FOS阳性反应, 其表达强度呈现阶段性变化。

关键词: 中国林蛙; 精巢; 原癌基因; 雌二醇; 雌激素受体; 免疫细胞化学
中图分类号: Q959.53; Q492　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0254-5853(2007)03-0303-08

Expression of *c-fos*, Oestradiol and Oestrogen Receptor in the Testis of *Rana chensinensis* at Different Stages

YANG Chun[1,2], ZHANG Yu-hui[1,*]
(1 *College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an*　710062, *China*;
2 *College of Life Science, Shanxi Normal University, Linfen*　041004, *China*)

Abstract: Localisation of FOS, 17β-oestradiol (E_2) and oestrogen receptors (ER) was investigated in testes at different stages of the spermatogenetic cycle of *Rana chensinensis*, using immunocytochemistry. The results showed that E_2 and ER are expressed in spermatogonia, spermatocytes, spermatids, spermatozoa, Sertoli cells and Leydig cells from stage Ⅰ to stage Ⅴ of spermatogenesis. A strong positive co-expression of E_2 and ER was observed in spermatids in stage Ⅱ and stage Ⅲ. The staining intensity of E_2 and ER in stage Ⅲ spermatozoa was significantly higher than in stages Ⅳ and Ⅴ ($P<0.01$). Expression of E_2 and ER in Sertoli cells appears in stage Ⅰ and decreases in intensity from stage Ⅱ to stage Ⅳ, but increases in stage Ⅴ. Expression of E_2 and ER in Leydig cells was higher in stage Ⅲ than in other stages. FOS was localised in spermatogonia, spermatocytes, spermatids, Sertoli cells and Leydig cells but not spermatozoa. Expression of FOS showed stage-specific characteristics.

Key words: *Rana chensinensis*; Testis; Proto-oncogene; Oestradiol-17β; Oestrogen receptor; Immunocytochemistry

早在20世纪30年代, 人们就认识到雄性动物可合成雌激素(O'donnell et al, 2001)。然而, 当时认为雌激素对精巢和雄性生殖功能的作用很小, 所以雄性的雌性激素功能被忽略。近年来, 将雌激素作为"雌性激素"; 而将睾酮作为"雄性激素"的传统观念受到挑战(Sharpe, 1997, 1998)。雌激素受体基因敲除(ERαKO)小鼠不育表明, 雌激素为雄性授精所必须(Eddy et al, 1996; Hess et al, 1997)。在哺乳类发育的各个阶段, 精巢都能合成雌激素并能对雌激素作出反应。雌激素对间质细胞、支持细胞、生精细胞的发育和功能维持非常重要(O'donnell et al, 2001)。对离体培养的小鼠支

* 收稿日期: 2006-11-06; 接受日期: 2007-03-05
基金项目: 陕西省自然科学基础研究计划项目(2001SM26)
* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: yu-huizhang@163.com

持细胞研究证实，雌激素在精子发生的调控中具有重要作用，雌激素的效应依赖于靶组织中雌激素受体的恰当表达（Mac Calman et al，1997）。尽管已有少数关于 ERα、ERβ 分布定位的报道，但是不同研究者的研究结果颇不一致（O'donnell et al，2001）。对理纹蝾螈（*Triturus marmoratus marmoratus*）的研究表明，雌激素调控蝾螈精巢的发育（Arenas et al，2001）。但用雌激素及其受体在两栖动物精巢表达的年周期变化，进而证实其与精子发生的关系仍未见报道。

原癌基因的蛋白产物广泛参与脊椎动物精子发生过程中的细胞生长、分化和形态建成（Cobellis et al，1999）。促性腺激素能够促进体外培养的猪间质细胞和大鼠支持细胞内原癌基因表达，但类固醇激素与原癌基因的关系仍不明确（Hall et al，1991）。在食用蛙（*Rana esculenta*），雌二醇（17β-estradiol，E_2）诱导 *c-fos* 在精巢中表达，而后 FOS 蛋白转运到精原细胞的核中，促使其分裂增殖（Cobellis et al，1999）。*c-fos* 对北方山溪鲵（*Batrachuperus tibetanus*）精原细胞的有丝分裂有促进作用（Li et al，2006），但与类固醇激素之间的关系未得到证实。在不同物种的精子发生中，*c-fos* 的表达存在着差异，E_2 诱导 *c-fos* 表达及其普遍性规律仍须更多的实验证实。

中国林蛙（*Rana chensinensis*）是我国重要的广布经济两栖动物（Ye et al，1993）。中国林蛙的精子发生属于非连续型，精巢系数的变化与精子发生的活动周期一致（Yang & Zhang，2005），婚垫发育的变化周期与精子发生进程和精巢系数具有相关性（Yang et al，2005）。中国林蛙的生精周期可划分为 5 个时期，Ⅰ期（5—7 月）为精原细胞增殖期；Ⅱ期（8—9 月）为精母细胞成熟分裂期；Ⅲ期（9—10 月）为精子形成期；Ⅳ期（11 月至翌年 2 月）为成熟精子贮存越冬期；Ⅴ期（翌年 3—5 月）为精子排放期（Yang & Zhang，2005）。由于中国林蛙精子发生的这一阶段性特点，使它成为研究激素调节精子发生机制的理想动物之一。本文采用免疫细胞化学方法检测原癌基因蛋白 FOS、E_2 及其受体（estrogen receptor，ER）在中国林蛙精巢内的表达定位，旨在探讨 *c-fos* 和 E_2 在精子发生中的调节机制，探索中国林蛙生殖活动的特点和规律，并为两栖动物生殖内分泌学研究积累资料。

1 材料和方法

1.1 切片的制备

中国林蛙雄性成体于 2002 年 5 月—2003 年 4 月采于秦岭北坡、西安市长安区大峪水库附近的沟麓地带，每月采集一次，每月实验用 6 只，共 72 只。24 h 内毁髓处死，剖腹摘取精巢。取材后立即置入新配制的改良 Bouin's 液固定 24 h，常规石蜡切片，厚 5—8 μm。切片裱于覆有铬钒明胶的载玻片上，置于恒温箱内烘干。

1.2 免疫细胞化学染色

采用 SABC 法进行免疫细胞化学反应。切片经脱蜡复水后，浸入新鲜配制的 3% H_2O_2 溶液中，室温处理 5—10 min 以灭活内源性酶，蒸馏水洗 2 min × 3 次。滴加复合消化液，室温 10 min，0.1 mol/L PBS 洗 2 min × 3 次。正常山羊血清室温封闭 20 min，甩去血清，滴加第一抗体，分别为兔抗人 E_2（1∶100，Boster 产品），兔抗人 ER（1∶100，Boster 产品）和兔抗人 FOS（1∶100，Boster 产品），4℃孵育 24 h，0.1 mol/L PBS 洗 2 min × 3 次。第二抗体为即用型羊抗兔 IgG（Boster 产品），25℃孵育 30 min，0.1 mol/L PBS 洗 2 min × 3 次。再滴加 SABC 复合物（Boster 产品），室温孵育 20 min，0.1 mol/L PBS 洗 5 min × 4 次。最后用 DAB 显色 5—15 min，用 0.1 mol/L PBS 充分冲洗以终止反应。蒸馏水冲洗后，脱水、透明、中性树胶封片，光镜下观察、拍照。空白对照用 PBS 替代第一抗体进行免疫细胞化学染色。

1.3 图像分析及统计学处理

切片在 Leica DMLB2 型光学显微镜下观察拍照。Qwin V_3 图像分析系统（Lecia）分别测定 1—12 月精巢的 FOS、E_2 和 ER 抗体免疫染色反应物的灰度值，每个材料选取 3 张切片，随机测试 10 个阳性细胞的灰度值。灰度分为 0—256 级，反映免疫阳性反应着色强弱。测量的灰度值越小，阳性反应越强。采用 SPSS10.0 软件中的 Kolmogorov-Smirnov 检验所得数据符合正态分布后，再进行单因子方差分析（ANOVA）。检测灰度值，数据以平均值 ± 标准误表示，取 $P < 0.01$ 作为差异显著性的界值。

2 结 果

2.1 生精细胞、支持细胞和间质细胞内 E_2 的表达

E_2阳性反应在胞质或/和胞核内，着色程度由浅黄至棕黄色，空白对照无阳性反应。在生精周期的Ⅰ—Ⅴ期，E_2阳性颗粒主要分布于精原细胞的胞核（图1，3，4，6）。在Ⅰ期，精原细胞E_2阳性反应，其平均灰度值为99.80±2.84，但不同时期精原细胞阳性反应强度无显著差异（表1）。精母细胞仅见于Ⅱ期和Ⅲ期，精母细胞胞核及胞质中有E_2阳性颗粒分布（图3，4）。在Ⅱ期和Ⅲ期，精子细胞中E_2呈强阳性反应，为棕黄色（图3，4）。Ⅲ—Ⅳ期，精子的E_2免疫反应由强减弱，由Ⅲ期的黄色转变为浅黄色（图5—8）。支持细胞中E_2表达强度经历由强减弱再增强的变化过程（表1，图1—6）。在Ⅲ期，间质细胞的阳性反应强度明显高于其他各期（表1）。

2.2　生精细胞、支持细胞和间质细胞内ER的表达

ER阳性反应也在胞质或（和）胞核内，着色程度由浅黄至棕黄色，空白对照无阳性反应。在生精周期的Ⅰ—Ⅴ期，精原细胞内均有ER阳性颗粒分布（图9，13，14），但不同时期ER阳性反应强度无显著差异（表2）。Ⅱ期和Ⅲ期，精母细胞ER呈阳性反应，为黄色。Ⅱ期和Ⅲ期，精子细胞的呈棕黄色（图11，12），为强阳性，其平均灰度值分别为83.70±4.46和85.79±3.68（表2）。Ⅲ—Ⅴ期，成熟精子头部是ER的主要反应部位（图12，13）。在Ⅲ期，精子阳性反应强度明显高于Ⅳ期和Ⅴ期（表2）。Ⅰ—Ⅴ期，ER在支持细胞内均有阳性反应，Ⅲ期反应最弱（图12），其平均灰度值为141.22±3.88（表2）。在Ⅲ期，间质细胞中ER的阳性反应强度明显高于Ⅰ期、Ⅳ期和Ⅴ期。

2.3　生精细胞、支持细胞和间质细胞内FOS的表达

FOS阳性反应同样在胞质或胞核内，着色程度有浅黄或棕黄色。在生精周期的Ⅰ—Ⅴ期，精原细胞核周和核内有FOS阳性反应（图15，20），但不同时期FOS阳性反应强度的差异不明显（表3）。在精母细胞中，FOS的阳性反应强度由Ⅱ期的阳性转变为Ⅲ期的弱阳性（表3），阳性反应位于核中（图16—18）。不同时期精子细胞内FOS的阳性反应强度存在显著差异，Ⅱ期的为强阳性，Ⅳ期的为弱阳性（表3；图16，18）。精子内FOS呈阴性。支持细胞中FOS表达强度经历由强减弱再增强的变化过程（表3；图17，19，20），Ⅳ期最弱，其平均灰度值为154.48±4.74（表3）。在Ⅲ期和Ⅴ期，间质细胞中FOS的阳性反应强度明显高于Ⅰ期、Ⅱ期和Ⅳ期（表3；图15，18—20）。

表1　中国林蛙生精周期中生精细胞、支持细胞和间质细胞内E_2阳性反应的灰度值

Tab. 1　Staining intensity (Grey level) of E_2 positive reactions in spermatogenic, Sertoli and Leydig cells in the spermatogenetic cycle of *Rana chensinensis* (mean ± *SE*)

阶段 Stage	精原细胞 Spermatogonia	精母细胞 Spermatocytes	精子细胞 Spermatids	精子 Spermatozoa	支持细胞 Sertoli cells	间质细胞 Leydig cells
Ⅰ期 Stage I	99.80 ± 2.84^a	—	—	—	92.69 ± 3.13^b	111.69 ± 2.37^a
Ⅱ期 Stage II	109.02 ± 3.01^a	113.08 ± 9.71^a	71.82 ± 5.19^b	—	117.52 ± 5.20^a	113.98 ± 3.04^a
Ⅲ期 Stage III	106.29 ± 2.33^a	114.22 ± 3.82^a	78.79 ± 8.37^b	108.47 ± 3.88^b	118.87 ± 3.66^a	90.16 ± 2.45^b
Ⅳ期 Stage IV	112.09 ± 2.39^a	—	119.49 ± 6.77^a	131.31 ± 5.20^a	110.50 ± 3.89^a	113.34 ± 2.80^a
Ⅴ期 Stage V	102.45 ± 3.28^a	—	—	129.01 ± 2.93^a	86.37 ± 2.85^b	120.30 ± 1.92^a

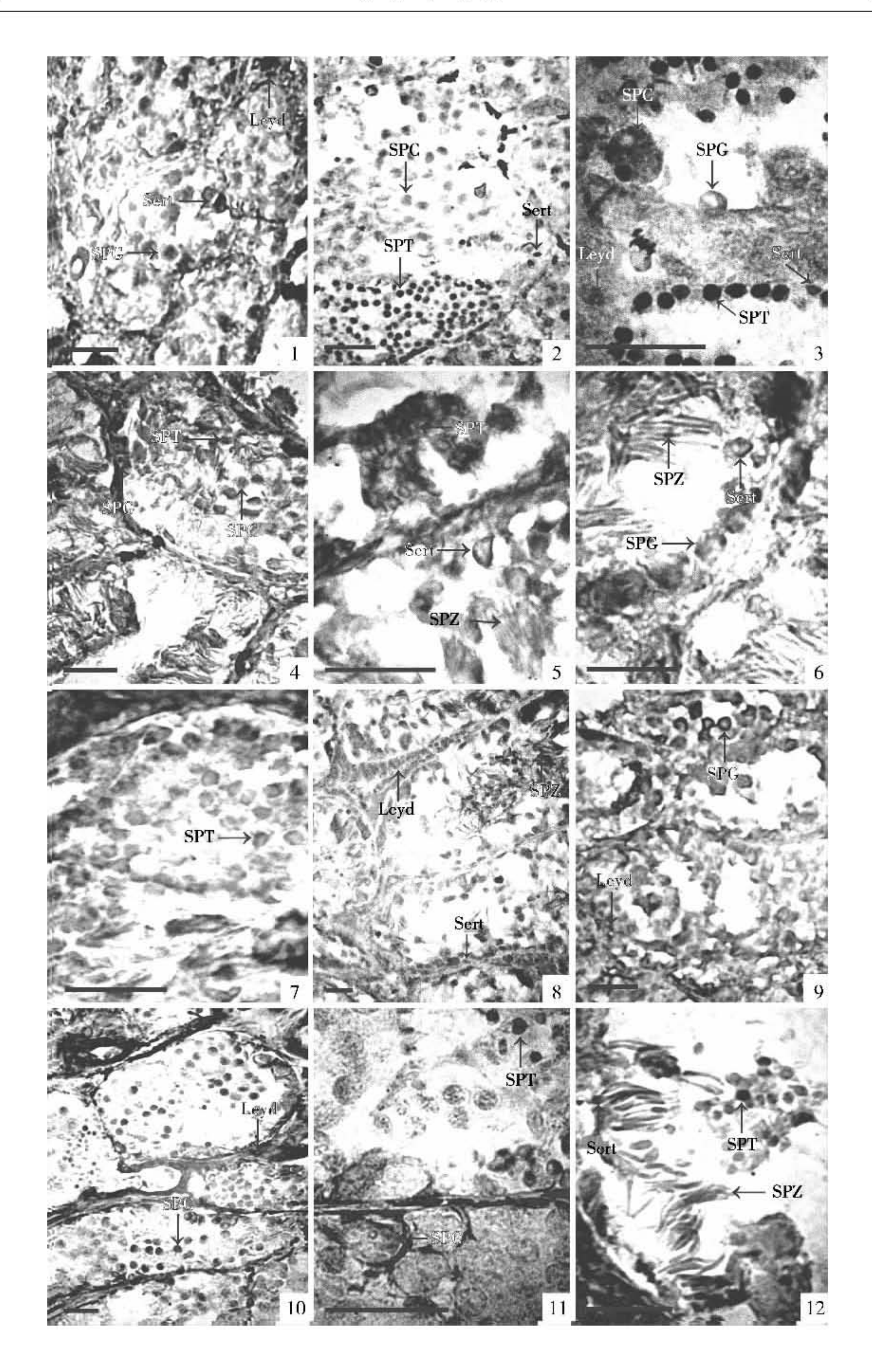
同列不同上标字母表示平均数间差异极显著（In the same column, means with different superscripts are significantly different. $n = 6$, $P < 0.01$, ANOVA-LSD）。—：该期未见此类细胞（Absence of cellular type in the stage）。

表2　中国林蛙生精周期中生精细胞、支持细胞和间质细胞内ER阳性反应的灰度值

Tab. 2　Staining intensity (Grey level) of ER positive reactions in spermatogenic, Sertoli and Leydig cells in the spermatogenetic cycle of *Rana chensinensis* (mean ± *SE*)

阶段 Stage	精原细胞 Spermatogonia	精母细胞 Spermatocytes	精子细胞 Spermatids	精子 Spermatozoa	支持细胞 Sertoli cells	间质细胞 Leydig cells
Ⅰ期 Stage I	108.48 ± 3.92^a	—	—	—	118.39 ± 4.82^{ab}	121.79 ± 2.75^a
Ⅱ期 Stage II	117.22 ± 2.91^a	121.46 ± 3.06^a	83.70 ± 4.46^b	—	138.59 ± 4.79^a	112.20 ± 6.36^{ab}
Ⅲ期 Stage III	122.14 ± 4.34^a	114.93 ± 2.50^a	85.79 ± 3.68^b	112.44 ± 4.24^b	141.22 ± 3.88^a	97.91 ± 4.69^b
Ⅳ期 Stage IV	121.66 ± 1.24^a	—	114.31 ± 2.70^a	133.62 ± 3.10^a	110.25 ± 8.05^b	116.55 ± 2.28^a
Ⅴ期 Stage V	115.71 ± 3.73^a	—	—	148.55 ± 3.50^a	97.34 ± 8.35^b	128.52 ± 4.82^a

同列不同上标字母表示平均数间差异极显著（In the same column, means with different superscripts are significantly different. $n = 6$, $P < 0.01$, ANOVA-LSD）。—：该期未见此类细胞（Absence of cellular type in the stage）。



Leyd
Sert
SPG
1
SPC
Sert
SPT
2
SPC
SPG
Leyd
Sert
SPT
3
SPT
SPG
SPG
4
SPT
Sert
SPZ
5
SPZ
Sert
SPG
6
SPT
7
Leyd
SPZ
Sert
8
SPG
Leyd
9
Leyd
SPC
10
SPT
SPG
11
Sert
SPT
SPZ
12

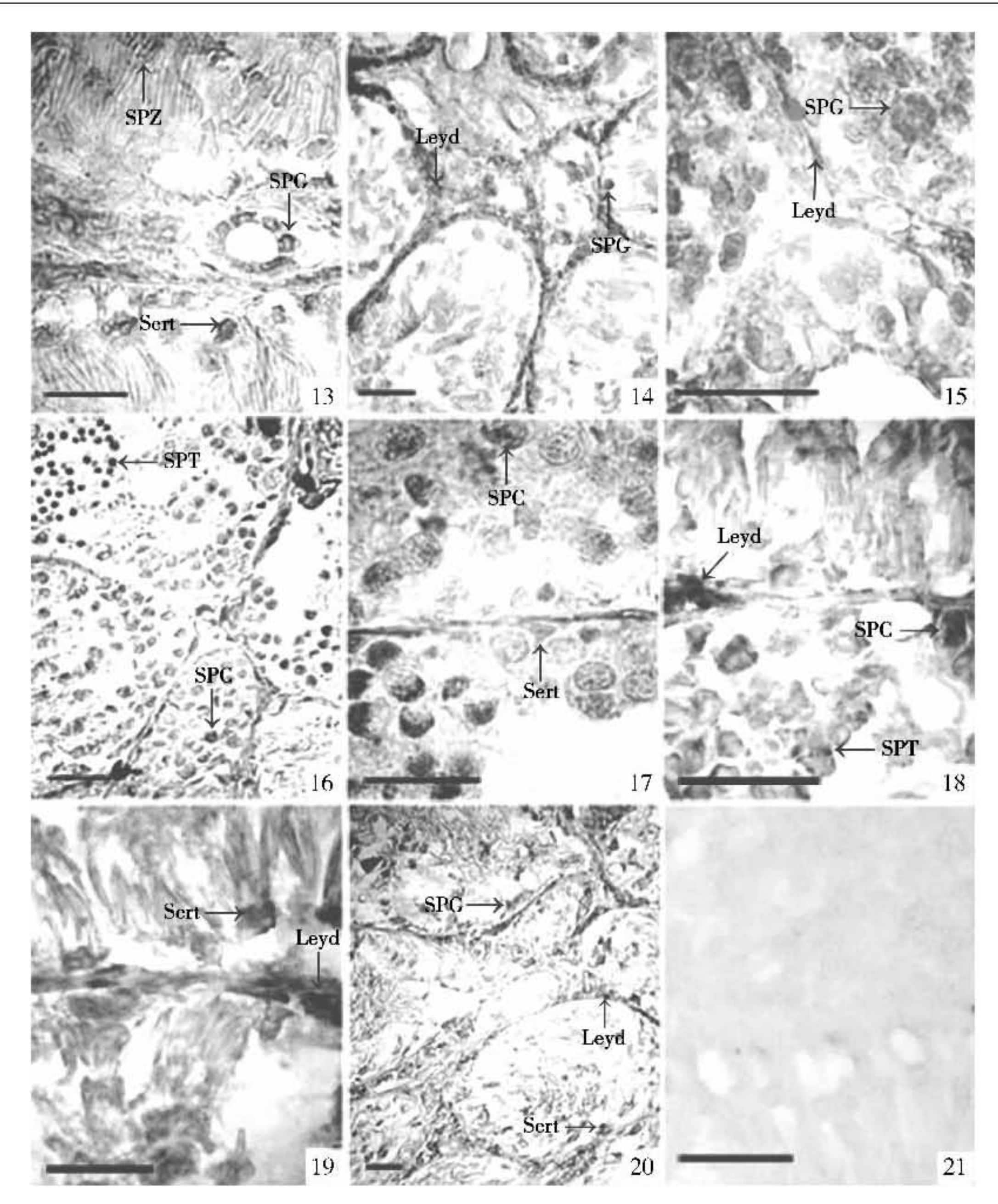


图 1—21　中国林蛙精巢中 E_2、ER 和 FOS 的免疫细胞化学定位

Figs. 1-21　Immunocytochemistry distribution of E_2, ER and FOS in testes of *Rana chensinensis*

SPG：精原细胞（Spermatogonia）；SPC：精母细胞（Spermatocytes）；SPT：精子细胞（Spermatids）；SPZ：精子（Spermatozoa）；Sert：支持细胞（Sertoli cells）；Leyd：间质细胞（Leydig cells）。

图中标尺均为 20 μm（Bar = 20 μm）。

1-8：E_2 阳性表达（E_2 is positive）；9-14：ER 阳性表达（ER is positive）；15-20：FOS 阳性表达（FOS is positive）；21．精巢阴性对照（Negative control）。

1，9，15：Ⅰ期（Stage Ⅰ）；2-3，10-11，16-17，21：Ⅱ期（Stage Ⅱ）；4-5，12，18：Ⅲ期（Stage Ⅲ）；6-7，13，19：Ⅳ期（Stage Ⅳ）；8，14，20：Ⅴ期（Stage Ⅴ）。

3　讨　论

3.1　E_2 在生精周期不同阶段的作用

雌激素对靶组织的作用由其受体 ER 介导，ER 作为配体激活的转录因子调控靶基因表达。ER 在配子发生和排放的调控、生殖行为、第二性征发育等复杂的生殖过程中发挥重要作用（Evans，1988）。本实验结果显示，在中国林蛙生精周期的不同时期，E_2 和 ER 在精巢中的细胞定位具有一致性，表明 E_2 可能通过 ER 参与中国林蛙精子发生的调控过程。

表3 中国林蛙生精周期中生精细胞、支持细胞和间质细内FOS阳性反应的灰度值

Tab. 3 Staining intensity (Gray level) of FOS positive reactions in spermatogenic, Sertoli and Leydig cells in the spermatogenetic cycle of *Rana chensinensis* (mean ± *SE*)

阶段 Stage	精原细胞 Spermatogonia	精母细胞 Spermatocytes	精子细胞 Spermatids	精子 Spermatozoa	支持细胞 Sertoli cells	间质细胞 Leydig cells
Ⅰ期 Stage I	112.88 ± 4.76^{c}	—	—	—	116.65 ± 4.96^{b}	117.02 ± 3.35^{b}
Ⅱ期 Stage II	127.65 ± 2.92^{b}	101.77 ± 6.84^{b}	83.98 ± 3.62^{c}	—	127.22 ± 3.14^{ab}	110.59 ± 2.55^{b}
Ⅲ期 Stage III	97.81 ± 0.87^{d}	153.85 ± 3.90^{a}	126.74 ± 2.75^{b}	-	121.78 ± 2.23^{ab}	86.20 ± 2.39^{c}
Ⅳ期 Stage IV	149.32 ± 4.82^{a}	—	145.21 ± 4.60^{a}	-	154.48 ± 4.74^{a}	134.44 ± 4.15^{a}
Ⅴ期 Stage V	123.37 ± 3.57^{bc}	—	—	-	113.49 ± 1.41^{bc}	94.85 ± 2.93^{c}

同列不同上标字母表示平均数间差异极显著(In the same column, means with different superscripts are significantly different. n = 6, $P < 0.01$, ANOVA-LSD)。—:该期未见此类细胞(Absence of cellular type in the stage)。-:阴性(Absence)。

在生精周期的Ⅰ—Ⅴ期，E_2和ER阳性反应主要在精原细胞的胞核，两者定位一致。在理纹蝾螈生殖周期的不同时期，精原细胞、精母细胞内均有ER阳性反应(Arenas et al, 2001)。在日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)精子发生的全过程，精巢内同样有ER表达(Miura et al, 1999)。这些与本实验结果相似，但中国林蛙生精周期不同阶段生精细胞的特征各异，E_2的作用也不尽相同。

在食用蛙，E_2诱导*c-fos*在精巢中表达，而后FOS蛋白转运到精原细胞的核中，促使其分裂增殖(Cobellis et al, 1999)。据此推测，在Ⅰ期，E_2的主要作用是诱导精原细胞增殖(Fasano et al, 1995)。在Ⅱ—Ⅳ期，精原细胞也接受E_2的调控，E_2有防止精原细胞凋亡、维持精原细胞活性的作用。在黑熊(*Ursus americanus*)冬眠后，雌激素对恢复精子发生过程具有重要作用(Carreau, 2001)。在中国林蛙生精周期的第Ⅴ期，E_2和ER的细胞定位表明，E_2可能在冬眠后精子发生的恢复中发挥重要作用，启动新一轮精子发生。林蛙的精母细胞仅见于生精周期的Ⅱ期和Ⅲ期，精母细胞胞核及胞质中有E_2阳性反应。基于ERβ参与小鼠减数分裂进程的负反馈调控或导致精母细胞凋亡的事实(Selva et al, 2004)，推断在Ⅱ—Ⅴ期，E_2也可能具有这两方面的作用。E_2和ER在精子细胞和成熟精子的核内的定位表明，E_2具有防止未变态精子细胞凋亡，维持成熟精子功能的作用(Robertson et al, 1999)。ER在文昌鱼(*Branchiostoma belcheri*)和理纹蝾螈的成熟精子中呈阴性反应(Fang et al, 2001; Arenas et al, 2001)，而中国林蛙的成熟精子内却有ER分布。在哺乳动物睾丸中，ERα、ERβ的定位仍有争议，动物的种属差异等原因可造成检测结果不一致(Wang et al, 2005)。

在哺乳动物不同发育时期的精巢中，间质细胞是E_2作用的初级靶细胞(Abney, 1999)。在两栖类，Moger(1980)曾报道，E_2能抑制斑泥螈(*Necturus maculosu*)间质细胞的类固醇生成。食用蛙精巢内有ER分布(Fasano et al, 1989)，E_2抑制雄激素产生(Pierantoni et al, 1986; Fasano et al, 1991)，而又能够增强精原细胞的增殖(Minucci et al, 1997)。在中国林蛙生精周期的Ⅰ—Ⅴ期，E_2和ER在间质细胞内均有表达，E_2可能作为一种旁分泌因子调控间质细胞的功能和发育。在食用蛙，雌激素通过抑制17α-羟化酶和C17-20裂解酶而减少雄激素的合成。E_2也可能通过减少间质细胞内雄激素的合成实现自我调控。本实验结果显示，不同类型生精细胞内均有E_2和ER阳性反应，在生精周期第Ⅲ期，精子细胞呈强阳性反应。间质细胞内E_2和ER的免疫反应强度明显高于其他各期。这说明，该时期精巢内E_2的合成较活跃，E_2对间质细胞内雄激素合成的抑制作用较其他时期明显。

支持细胞在精子发生的建立和维持中发挥重要的作用(Sneddon et al, 2005)。支持细胞与生精细胞存在形态结构上的联系，并且能合成和分泌包括类固醇、生长因子、阿片肽、蛋白酶和前列腺素在内的大量因子(Weinbauer & Wessels, 1999)。用类固醇结合测定法证实，大鼠和小鼠的间质细胞与支持细胞内均有ER分布(Mahato et al, 2001)。E_2通过ERβ调控支持细胞的功能(Sneddon et al, 2005)。在中国林蛙生精周期的Ⅰ—Ⅴ期，支持细胞中E_2和ER表达强度经历由强减弱再增强的变化过程，表明E_2对支持细胞的功能调控具有明显的阶段性，E_2通过支持细胞的介导参与精子发生调控(Miura et al, 1999)。中国林蛙生精周期的Ⅱ期和Ⅲ期，支持细胞的E_2阳性反应较生精细胞弱，生精细胞也可能合成E_2以满足精子发生的调控需求。在人类，雌激素作为促性腺激素分泌负反馈调

控子，施加雌激素能增强男性避孕药物的促性腺激素抑制效应（Handelsman et al，2000）。在食用蛙，E_2 能强烈地抑制促性腺激素的释放（Cobellis et al，1999）。因此推测，E_2 也可能参与中国林蛙精子发生的负反馈调节。运用 RT-PCR 方法研究发现，大鼠的间质细胞、支持细胞、精母细胞、精子细胞和精子中均有细胞色素 P450 芳香化酶 mRNA 表达，表明生精细胞也能合成 E_2（Carreau，2001）。在中国林蛙，生精细胞、支持细胞、间质细胞内均有 E_2 分布，表明这些细胞均有可能合成 E_2，并通过旁分泌和自分泌方式调节类固醇激素的合成，以维持生精周期不同阶段类固醇激素的适宜浓度。

3.2　*c-fos* 在生精周期不同阶段的作用

原癌基因 *c-fos* 的蛋白产物作为核转录因子在细胞增殖和分化中发挥重要作用。在欧洲红狐（*Vulpes vulpes*），*c-fos* 参与精原细胞到精子细胞发育的全过程（Cohen et al，1993）。中国林蛙的精原细胞、精母细胞和精子细胞内均有 FOS 阳性颗粒分布，这一结果支持上述结论。在食用蛙，当新一轮精子发生开始后，FOS 由初级精原细胞的胞质转移至核中（Cobellis et al，2002），表明 FOS 由胞质转运到核中调控精子发生进程。在中国林蛙生精周期的Ⅰ期和Ⅱ期，FOS 在精原细胞和精母细胞核与核周区域的定位反映了 FOS 由胞质到核的转运途径。FOS 还可能在生精细胞有丝分裂向成熟分裂的转化过程中发挥某种作用（Li et al，2006）。在精原细胞分裂活动减弱或消失的Ⅱ—Ⅳ期，FOS 也在生精细胞核周分布（Chieffi et al，1997）。在生精周期的第Ⅴ期，精原细胞的少量增殖与 FOS 的核内分布有关。

中国林蛙支持细胞内有 FOS 阳性反应，食用蛙和蜥蜴（*Podarcis s. sicula*）中也存在类似情况（Chieffi et al，1995，1997），表明原癌基因 *c-fos* 可能参与支持细胞和生精细胞间通讯（Jégou，1993）。哺乳动物的在体和离体实验证实，间质细胞内有 *c-myc*、*c-fos* 和 *c-jun* 的表达（Hall et al，1991）。中国林蛙间质细胞内 FOS 呈阳性反应与食用蛙间质细胞内的检测结果一致（Chieffi et al，1995）。精子形成和精子排放需要合成类固醇激素来维持。在生精周期的Ⅲ期和Ⅴ期，间质细胞内 FOS 免疫反应呈强阳性，表明间质细胞内原癌基因的活性可能与类固醇激素合成调控有关。在中国林蛙生精周期的第Ⅰ期，E_2 和 FOS 在精原细胞内的定位说明，E_2 可能诱导精原细胞内原癌基因表达、促进精原细胞有丝分裂。在生精周期的第Ⅲ期，间质细胞内 E_2 和 FOS 均呈强阳性反应，说明 E_2 同样能够诱导间质细胞中 *c-fos* 表达。然而，*c-fos* 活性在类固醇激素合成调控和精巢生理环境维持中的作用还有待进一步研究（Chieffi et al，1995）。

总之，在中国林蛙生精周期的不同阶段，E_2 通过定位于各类生精细胞的 ER 发挥调控作用，诱导精原细胞增殖、防止生精细胞凋亡、维持成熟精子功能。E_2 可能在冬眠后精子发生的恢复中发挥重要作用。E_2 通过旁分泌和自分泌方式调节间质细胞和支持细胞的类固醇合成，以维持生精周期不同阶段类固醇激素的适宜浓度。E_2 可能参与中国林蛙精子发生的负反馈调控。除支持细胞和间质细胞外，生精细胞也有可能合成 E_2。*c-fos* 参与精原细胞到精子细胞发育的全过程。

参考文献：

Abney TO. 1999. The potential roles of estrogens in regulating Leydig cell development and function: A review [J]. *Steroids*, **64** (9): 610-617.

Arenas MI, Royuela M, Lobo MV, Alfaro JM, Fraile B, Paniagua R. 2001. Androgen receptor (AR), estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and estrogen receptor-beta (ER-beta) expression in the testis of the newt, *Triturus marmoratus* marmoratus during the annual cycle [J]. *J Anat*, **199** (4): 465-472.

Carreau S. 2001. Germ cells: A new source of estrogens in the male gonad [J]. *Mol Cell Endocrinol*, **178** (1-2): 65-72.

Chieffi P, Angelini F, Pierantoni R. 1997. Proto-oncogene activity in the testis of the lizard, *Podarcis s. sicula*, during the annual reproductive cycle [J]. *Gen Comp Endocrinol*, **108** (2): 173-181.

Chieffi P, Minucci S, Cobellis G, Fasano S, Pierantoni R. 1995. Changes in proto-oncogene activity in the testis of the frog, *Rana esculenta*, during the annual reproductive cycle [J]. *Gen Comp Endocrinol*, **99**: 127-136.

Cobellis G, Meccariello R, Fienga G, Pierantoni R, Fasano S. 2002. Cytoplasmic and nuclear Fos protein forms regulate resumption of spermatogenesis in the frog, *Rana esculenta* [J]. *Endocrinology*, **143** (1): 163-170.

Cobellis G, Pierantoni R, Minucci S, Pernas-Alonso R, Meccariello R, Fasano S. 1999. *c-fos* activity in *Rana esculenta* testis: Seasonal and estradiol-induced changes [J]. *Endocrinology*, **140** (7): 3238-3244.

Cohen DR, Vandermark SE, McGovern JD, Bradley MP. 1993. Transcriptional regulation in the testis: A role for transcription factor AP-1 complexes at various stages of spermatogenesis [J]. *Oncogene*, **8** (2): 443-455.

Eddy EM, Washburn TF, Bunch DO, Goulding EH, Gladen BC, Lubahn DB, Korach KS. 1996. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and

infertility [J]. *Endocrinology*, **137** (11): 4796-4805.

Evans RM. 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily [J]. *Science*, **240** (4854): 889-895.

Fang Y, Weng Y, Hu X. 2001. Distribution of sex steroid hormones and their receptors in the gonads and nervoussystem of amphioxus (*Branchiostoma belcheri*) [J]. *Acta Zool Sin*, **47** (4): 398-403. [方永强, 翁幼竹, 胡晓霞. 2001. 性类固醇激素及其受体在文昌鱼性腺和神经系统中的分布. 动物学报, **47** (4): 398-403.]

Fasano S, Chieffi P, Minucci S, Le Guellec K, Jegou B, Pierantoni R. 1995. Detection of *c-mos* related products in the dogfish (*Scyliorhinus canicula*) testis [J]. *Mol Cell Endocrinol*, **109** (2): 127-132.

Fasano S, D'Antonio M, Pierantoni R. 1991. Sites of action of local estradiol feed back mechanism in the frog (*Rana esculenta*) testis [J]. *Gen Comp Endocrinol*, **81**: 492-499.

Fasano S, Pierantoni R, Minucci S, Di Matteo L, Chieffi G. 1989. Seasonal fluctuations of estrogen binding activity in the testis of the frog, *Rana esculenta* [J]. *Gen Comp Endocrinol*, **74**: 157-161.

Hall SH, Berthelon MC, Avallet O, Saez JM. 1991. Regulation of *c-fos*, *c-jun*, *junB*, and *c-myc* messenger ribonucleic acids by gonadotropin and growth factors in cultured pig Leydig cells [J]. *Endocrinology*, **129**: 1243-1249.

Handelsman DJ, Wishart S, Conway AJ. 2000. Oestradiol enhances testosterone-induced suppression of human spermatogenesis [J]. *Hum Reprod*, **15** (3): 672-679.

Hess RA, Bunick D, Lee KH, Bahr J, Taylor JA, Korach KS, Lubahn DB. 1997. A role for oestrogens in the male reproductive system [J]. *Nature*, **390** (6659): 509-512.

Jégou B. 1993. The Sertoli-germ cell communication network in mammals [J]. *Int Rev Cytol*, **147**: 25-96.

Li Y, ZHang Y, Wang H, Lei X. 2006. Expression of *c-fos* and *c-myc* during Spermatogenesis of Stream Salamander [J]. *Chn J Zool*, **41** (2): 29-36. [李亚琳, 张育辉, 王宏元, 雷 忻. 2006. *c-fos* 和 *c-myc* 在北方山溪鲵精子发生中的表达. 动物学杂志, **41** (2): 29-36.]

Mac Calman CD, Getsios S, Farookhi R, Blaschuk OW. 1997. Estrogens potentiate the stimulatory effects of follicle-stimulating hormone on N-cadherin messenger ribonucleic acid levels in cultured mouse Sertoli cells [J]. *Endocrinology*, **138** (1): 41-48.

Mahato D, Goulding EH, Korach KS, Eddy EM. 2001. Estrogen receptor-alpha is required by the supporting somatic cells for spermatogenesis [J]. *Mol Cell Endocrinol*, **178** (1-2): 57-63.

Minucci S, Di Matteo L, Chieffi P, Pierantoni R, Fasano S. 1997. 17β-estradiol effects on mast cell number and spermatogonial mitotic index in the testis of the frog, *Rana esculenta* [J]. *J Exp Zool*, **278**: 93-100.

Miura T, Miura C, Ohta T, Nader MR, Todo T, Yamauchi K. 1999. Estradiol-17 beta stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **264** (1): 230-234.

Moger WH. 1980. Direct effects of estrogens on the endocrine function of the mammalian testis [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, **58** (9): 1101-1022.

O'donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER. 2001. Estrogen and spermatogenesis [J]. *Endocr Rev*, **22** (3): 289-318.

Pierantoni R, Varriale B, Minucci S, Di Matteo L, Fasano S, D'Antonio M, Chieffi G. 1986. Regulation of androgen production by frog (*Rana esculenta*) testis: An *in vitro* study on the effects exerted by estradiol, 5-dihydrotestosterone, testosterone, melatonin and serotonin [J]. *Gen Comp Endocrinol*, **64**: 405-410.

Robertson KM, O'donnell L, Jones ME, Meachem SJ, Boon WC, Fisher CR, Graves KH, McLachlan RI, Simpson ER. 1999. Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96** (14): 7986-7991.

Selva DM, Tirado OM, Toran N, Suarez-Quian CA, Reventos J, Munell F. 2004. Estrogen receptor beta expression and apoptosis of spermatocytes of mice overexpressing a rat androgen-binding protein transgene [J]. *Biol Reprod*, **71** (5): 1461-1468.

Sharpe RM. 1997. Do males rely on female hormones? [J]. *Nature*, **390** (6659): 447-448.

Sharpe RM. 1998. The roles of oestrogen in the male [J]. *Trends Endocrinol Metab*, **9**: 371-377.

Sneddon SF, Walther N, Saunders PT. 2005. Expression of androgen and estrogen receptors in sertoli cells: Studies using the mouse SK11 cell line [J]. *Endocrinology*, **146** (12): 5304-5312.

Wang H, Tai F, Lian Y. 2005. Age-specific changes in estrogen receptors α in testis and epididymis of mandarin voles (*Microtus mandarinus*) [J]. *Zool Res*, **26** (4): 435-441. [王慧春, 邰发道, 廉漪. 2005. 棕色田鼠睾丸和附睾雌激素 α 受体表达的增龄变化. 动物学研究, **26** (4): 435-441.]

Wang H, Zhang Y. 2004. Annual cycle of testicular microstructures in stream salamanders (*Batrachuperus tibetanus*) [J]. *Zool Res*, **25** (6): 484-490. [王宏元, 张育辉. 2004. 北方山溪鲵精巢显微结构的年周期变化. 动物学研究, **25** (6): 484-490.]

Weinbauer GF, Wessels J. 1999. 'Paracrine' control of spermatogenesis [J]. *Andrologia*, **31** (5): 249-262.

Yang C, Zhang Y, Cui H. 2005. Correlation between the changes of microstructure and testosterone in nuptial pad of the frog, *Rana chensinensis* [J]. *Zool Res*, **26** (6): 638-644. [杨 纯, 张育辉, 崔慧婷. 2005. 中国林蛙婚垫的显微结构变化及其与睾酮的关系. 动物学研究, **26** (6): 638-644.]

Yang C, Zhang Y. 2005. Annual variation of the testicular microstructures of *Rana chensinensis* in the north slope of Qinling mountains [J]. *Chn J Zool*, **40** (3): 81-85. [杨 纯, 张育辉. 2005. 秦岭北坡中国林蛙精巢显微结构的年周期变化. 动物学杂志, **40** (3): 81-85.]

Ye CY, Fei L, Hu SQ. 1993. Rare and Economic Amphibians of China [M]. Chengdu: Sichuan Publ House Science and Technology, 212-215. [叶昌媛, 费 梁, 胡淑琴. 1993. 中国珍稀及经济两栖动物. 成都: 四川科学技术出版社, 212-215.]